

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 547–550

Enzymatische Bestimmung von Xylit und Sorbit nach dem Endwertverfahren

Von K. H. Bäßler, K. Wagner und B. Schönerstedt

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Mainz

(Eingegangen am 17. April/15. Juni 1978)

Zusammenfassung: Eine enzymatische Endwertmethode zur Bestimmung von Xylit und Sorbit mit *L*-Iditdehydrogenase wird beschrieben. Trotz Anwendung von pH 9 und Semicarbazid läuft die Reaktion nur zu etwa 80% ab. Deshalb muß mit einem Standard gearbeitet werden. Für Bestimmungen im Serum liegt die untere Grenze der Meßbarkeit bei 0,1 mmol/l. Im günstigsten Meßbereich zwischen 0,4 und 1,2 mmol/l liegen die Variationskoeffizienten um 4%. Empfindlichkeit und Präzision sind höher als bei der früher beschriebenen kinetischen Methode. Weitere Vereinfachungen für die Routinekontrolle der Infusionstherapie werden vorgeschlagen.

Enzymatic determination of xylitol and sorbitol

Summary: An enzymatic endpoint determination of xylitol and sorbitol by the use of *L*-iditol dehydrogenase is described. Despite the use of pH 9 and the addition of semicarbazide, the reaction goes only 80% to completion. Therefore a standard value has to be used. The lower limit for measurement of concentrations in serum is around 0.1 mmol/l. The most favorable range is between 0.4 and 1.2 mmol/l with a coefficient of variation of below 4%. Sensitivity and precision is higher than with the kinetic method described earlier. Further simplification for the routine control of infusion therapy with polyols is suggested.

Einleitung

Die früher von uns beschriebene kinetische Methode zur Bestimmung von Xylit (1, 2) scheint in vielen Kliniken Schwierigkeiten zu bereiten, was wohl mit dem ungewohnten Prinzip und mit der Notwendigkeit des Umrechnens bei der doppelt reziproken Auftragung zusammenhängt. Jedenfalls wird als Argument gegen die Anwendung von Xylit in der Infusionstherapie u. a. angeführt, daß wegen der schwierigen Bestimmung eine Kontrolle nicht möglich sei (3). Um diesen Einwand zu entkräften und zu zeigen, daß jedes Labor, das in der Lage ist, Glucose oder Lactat zu bestimmen, auch Xylit und Sorbit bestimmen kann, wird im folgenden eine enzymatische Endwertmethode mitgeteilt. Maurer & Christophis (4) haben bereits 1973 eine ähnliche Methode publiziert. Die hier beschriebene Modifikation hat den Vorteil der Zeitersparnis durch kürzere Reaktionsdauer. Ferner entfällt die Komplexbildung von NAD^+ mit Hydrazin, so daß ein Reagentien-Leerwert nicht erforderlich ist. Die Methode hat sich bei uns in der Routine bewährt und wird in ähnlicher Weise auch in anderen Instituten angewandt¹⁾. Eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit haben wir durch Registrierung des Reaktionsablaufs mit einem Kompensationsschreiber erreicht.

Methodik

Prinzip

Xylit (bzw. Sorbit) wird mit Sorbitdehydrogenase (*L*-iditol: NAD 5-Oxidoreductase EC 1.1.1.14) zu *D*-Xylulose (bzw. *D*-Fructose) dehydriert:



bzw.



Der durch Reduktion von NAD^+ verursachte Absorptionsanstieg wird bei 365, 334 oder 340 nm gemessen.

Damit die Reaktion in ausreichendem Umfang nach rechts abläuft, wird bei pH 9 und unter Zusatz von Semicarbazid als Carbonylfänger gearbeitet. Da trotz dieser Maßnahmen nur ein Umsatz von knapp über 80% erfolgt, wird jeweils ein Standardwert mitgeführt, um auf 100% Wiederfindung umrechnen zu können. Im folgenden wird die Methode für Xylit beschrieben; die Sorbitbestimmung erfolgt einschließlich der Berechnung in genau gleicher Weise.

¹⁾ Herrn Prof. Dr. K. Brand, Lehrstuhl II des Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, danken wir für den Erfahrungsaustausch bei der Xylitbestimmung. Auf seine Anregung geht die Verwendung von Semicarbazid als Carbonylfänger anstelle von Hydrazin zurück.

Reagenzien

- 1 mol/l Perchlorsäure: 6 ml 700 g/kg Perchlorsäure ($d = 1,67$) mit dest. Wasser auf 70 ml verdünnen.
- 0,6 mol/l K_3PO_4 : 20,3 g tri-Kaliumphosphat-7-hydrat (Merck Nr. 5103) auf 100 ml mit dest. Wasser lösen.
- Glycin: Semicarbazid-Puffer (1:0,2 mol/l): 7,51 g Glycin und 2,2 g Semicarbazidhydrochlorid in wenig dest. Wasser lösen, mit 2 mol/l NaOH auf pH 9 einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.
- 0,13 mol/l β -NAD $^+$: 432,5 mg β -NAD $^+$ (Boehringer Mannheim Best. Nr. 15 298) auf 5,0 ml mit dest. Wasser lösen, auf pH 7 einstellen.
- Sorbitdehydrogenase: Boehringer Mannheim, Best. Nr. 15316; 10 mg (60 mg Lyophilisat) in 2 ml dest. Wasser lösen. Bei 0–4 °C mehrere Wochen haltbar.
- Standard (0,4 mmol/l): Die verwendeten Substanzen müssen getrocknet sein. Stammlösung: 304,3 mg Xylit bzw. 364,34 mg Sorbit in 10 ml dest. Wasser lösen. 0,1 ml der Stammlösung mit dest. Wasser auf 50 ml verdünnen.

Probennahme und Vorbereitung

0,1 ml Serum mit 0,2 ml 1 mol/l Perchlorsäure enteiweißen. Zentrifugieren. 0,2 ml Überstand im Eisbad zur Ausfällung von Perchlorat mit 0,2 ml 0,6 mol/l K_3PO_4 versetzen. Nach 10 min zentrifugieren. 0,2 ml Überstand als Probe in Test einsetzen (bei hohen Substratkonzentrationen auch entsprechend weniger).

Messung

Photometer Eppendorf mit Kompensationsschreiber. Meßstrahlung 365 nm; Mikroküvetten (Absaugküvetten) mit 1 cm Schichtdicke; Messung bei Raumtemperatur gegen Luft. Testvolumen 0,9 ml. In eine Küvette pipettieren:

0,5 ml Glycin-Semicarbazid-Puffer
 0,05 ml dest. Wasser
 0,1 ml β -NAD $^+$ -Lösung
 0,2 ml Probe (falls weniger, Differenz zu 0,2 ml durch dest. Wasser ergänzen)

Mischen. Absorption bei 365 nm schreiben bei voller Spreizung (1 cm Schreiberausschlag entspricht $\Delta A = 0,0125$). Eine evtl.

durch Mischung bedingte Absorptionsänderung kommt nach kurzer Zeit zum Stillstand. Dann Start der Reaktion mit 0,05 ml Sorbitdehydrogenase.

Warten bis die Reaktion wieder zum Stillstand gekommen ist (ca. 10 min). Aus Schreiberausschlag ergibt sich ΔA .

Zu jeder Meßreihe werden drei Standards mitgeführt, die 0,04 μ mol Xylit bzw. Sorbit enthalten (100 μ l der Standardlösung statt der Probe; Volumendifferenz durch dest. Wasser ergänzen).

Berechnung

Bei Bezug auf den Mittelwert der drei Standards erhält man die Konzentration an Xylit bzw. Sorbit im Serum in mmol/l unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors:

$$c_{\text{Probe}} = \frac{\Delta A_{\text{Probe}}}{\Delta A_{\text{Standard}}} \cdot 0,04 \cdot \frac{6}{V_P} \quad (\text{Gl. 1})$$

(V_P = Probenvolumen in ml)

Bei Verwendung eines Kompensationsschreibers ist es einfacher, anstelle von ΔA gleich den Schreiberausschlag in mm in die Berechnung einzusetzen.

Ergebnisse

Richtigkeit, Präzision und Empfindlichkeit

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden sowohl wäßrige Lösungen von Xylit und Sorbit zum Test eingesetzt, als auch Serumproben nach Zusatz verschiedener Mengen Xylit oder Sorbit.

Die in der zur Messung eingesetzten Probe gefundene Menge x in μ mol wurde berechnet nach

$$x = \frac{\Delta A \cdot V_K}{\epsilon \cdot d} \quad (\text{Gl. 2})$$

Tab. 1. Wiederfindung von Xylit aus wäßriger Lösung und aus Serum.

	Wiederfindung aus wäßriger Lösung					Wiederfindung aus Serum		
	Menge in der zum Test eingesetzten Probe (nmol)					Menge in der zum Test eingesetzten Probe (nmol)		
Anzahl der Proben	15	14	15	15	15	25	25	25
Eingesetzt:	5	10	20	40	80	10	20	40
Wiedergefunden: \bar{x}	3,5	7,7	17,0	33,0	61,2	8,1	16,4	34,4
s	0,2	0,7	0,8	1,3	2,0	0,7	0,6	1,3
%	70	77	85	83	77	81	82	86
VK(%)	5,7	9	4,7	3,9	3,3	8,2	3,7	3,8

Tab. 2. Wiederfindung von Sorbit aus wäßriger Lösung und aus Serum.

	Wiederfindung aus wäßriger Lösung					Wiederfindung aus Serum		
	Menge in der zum Test eingesetzten Probe (nmol)					Menge in der zum Test eingesetzten Probe (nmol)		
Anzahl der Proben	11	10	10	10	10	5	14	19
Eingesetzt:	5	10	20	40	80	10	20	40
Wiedergefunden: \bar{x}	3,6	8,5	15,5	34,2	66,5	8,4	15,4	33,2
s	0,5	0,5	0,7	1,9	2,5	0,5	0,8	1,2
%	72	85	78	86	83	84	77	83
VK(%)	14	5,9	4,5	5,6	3,8	5,9	5	3,7

Die im Serum gefundene Konzentration c (mmol/l) wurde berechnet nach

$$c = \frac{\Delta A \cdot V_K \cdot 6}{\epsilon \cdot d \cdot V_P} \quad (\text{Gl. 3})$$

(V_K = Gesamtvolumen in der Küvette in ml; V_P = Probenvolumen in ml; d = Schichtdicke in cm; ϵ = Absorptionskoeffizient für NADH ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$) = 3,4 bei 365 nm).

Tabelle 1 und Tabelle 2 zeigen die Ergebnisse für Xylit und Sorbit.

Der Umsatz beträgt im Mittel 81%.

Eine Menge von 0,01 μmol Substrat pro Küvette entspricht einem Schreibernausschlag von etwa 2 cm ($\Delta A = 0,025$) und läßt sich mit einem Variationskoeffizienten (VK) von 6–8% gut messen. Bei der oben beschriebenen Aufarbeitung lassen sich daher Konzentrationen im Serum von 0,2 mmol/l Xylit bzw. Sorbit (30 bzw. 36 mg/l) gut bestimmen. Die unterste Grenze liegt um 0,1 mmol/l (eine Steigerung der Empfindlichkeit könnte durch Messung bei 334 oder 340 nm erreicht werden). Der günstigste Meßbereich liegt zwischen 0,4 und 1,2 mmol/l mit VK von knapp unter 4%. Bei höheren Konzentrationen ist es zweckmäßig, statt 0,2 ml nur 0,1 ml Probe in den Test einzusetzen. Bei Xylitinfusionen mit einer Geschwindigkeit von 0,125 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, wie sie bei Routineinfusionen meist gebräuchlich sind, sind im Serum Konzentrationen um 1 mmol/l zu erwarten (5).

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen aus Serum bei Bezug auf einen Standard wie unter „Methodik“ beschrieben.

Bei der klinischen Routineüberwachung während der Infusionstherapie mit Polyolen sind wegen der relativ hohen Konzentrationen die Anforderungen an die Empfindlichkeit nicht so hoch. Auf den Gebrauch eines Kompensationsschreibers kann daher in diesem Fall

auch verzichtet werden, was den apparativen Aufwand reduziert.

Spezifität

Zwischen Xylit und Sorbit kann nicht differenziert werden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit wird die Summe der molaren Konzentrationen bestimmt.

Glycerin hat bis zu Konzentrationen im Serum von 10 mmol/l keinen Einfluß auf die Messung von Xylit und Sorbit.

Andere Polyalkohole, die mit *L*-Iditdehydrogenase reagieren, kommen im Serum nicht in meßbaren Mengen vor.

Im Harn von nicht mit Polyolen behandelten Personen finden wir dagegen in Übereinstimmung mit *Pitkänen* (6) stets eine geringe Menge an Polyolen in der Größenordnung von 100–300 μmol im 12-Stunden-Urin, die mit *L*-Iditdehydrogenase reagieren und mit der enzymatischen Methode nicht zu identifizieren sind.

Vergleich mit der kinetischen Methode

Die Empfindlichkeit der hier beschriebenen Endwertmethode ist wesentlich höher als die der kinetischen Methode (2). Bei letzterer können Konzentrationen im Serum um 2,6 mmol/l mit einem VK von 12,8% bestimmt werden. Die untere Grenze für eine exakte Bestimmung liegt um 1,3 mmol/l.

Bestimmung im Harn

Harn kann wie früher beschrieben (2, 4) je nach Gehalt direkt oder nach Verdünnung mit Wasser in den Test eingesetzt werden. Trüber Harn muß filtriert werden.

Danksagung

Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Unterstützung.

Tab. 3. Wiederfindung von Xylit und Sorbit nach Zusatz zu Serum bei Berechnung über einen Standard. Präzision in der Serie. Durchführung und Ansatz wie unter Methodik beschrieben. Berechnung nach Gleichung 1.

	Xylit			Sorbit		
Konzentration im Serum (mmol/l)	0,3	0,6	1,2	0,3	0,6	1,2
Zahl der Proben	25	25	25	5	14	18
Wiedergefunden (mmol/l)	0,29	0,59	1,24	0,29	0,55	1,17
Wiederfindung in %	96,7	98	103	96,7	91,7	97,5
s (mmol/l)	0,024	0,022	0,05	0,016	0,026	0,044
VK%	8,39	3,69	4,03	5,45	4,8	3,76

Literatur

1. Bäßler, K. H., Unbehaun, V. & Prellwitz, W. (1962), Biochem. Z. 336, 35–40.
2. Bäßler, K. H. (1974), in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U. ed.), 3. Aufl. S. 1425–1428 Verlag Chemie, Weinheim.
3. Göschke, H. & Leutenegger, A. (1975), in Klinische Anästhesiologie und Intensivtherapie. 7. Infusionstherapie II. Parenterale Ernährung (Ahnefeld, F. W., Burri, C., Dick, W. & Halmágyi, M. eds.) S. 141–147. Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
4. Maurer, C. & Christophis, P. (1973), diese Z. 11, 535–536.
5. Bäßler, K. H. (1976), in Monosaccharides and polyalcohols in nutrition, therapy and dietetics (Ritzel, G. & Brubacher, G., eds.), S. 22–30. Verlag Hans Huber, Bern–Stuttgart–Wien.
6. Pitkänen, E. (1972), Clin. Chim. Acta 38, 221–230.

Prof. Dr. K. H. Bäßler
Physiol.-Chem. Institut
Saarstraße 21
6500 Mainz